



**UNIVERSITE DES SCIENCES**

*Biologie, Agrosociétés*

Master 2 parcours Interactions Microorganismes/ Hôtes/Environnements (IMHE)

HMBA403

# Etude de la diversité fongique présente dans des écosystèmes forestiers contrastés de Guyane

Par

**Amandine DUCOUSSO-DETREZ**

Stage effectué au CIRAD, UMR AGAP

**Directeurs de stage :**

**Dr. Alba ZAREMSKI :** [alba.zaremski@cirad.fr](mailto:alba.zaremski@cirad.fr)

**Dr. Jacques BEAUCHENE :** [jacques.beauchene@cirad.fr](mailto:jacques.beauchene@cirad.fr)

Du 16 Janvier au 14 Juillet 2017



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Alba ZAREMSKI et Monsieur Jacques BEAUCHENE qui sont à l'origine de ce projet et qui m'ont permis de réaliser ce stage.

Merci à Alba ZAREMSKI de m'avoir fait confiance pour nouer les collaborations, prendre contact avec les fournisseurs, préparer les devis, etc., j'y ai gagné en assurance, autonomie et efficacité !

Merci également à Jacques BEAUCHENE pour ses remarques et son accompagnement bienveillant depuis la Guyane ; je lui suis reconnaissante, en particulier d'avoir réalisé la collecte des échantillons destinés à l'étude métagénomique. J'espère un jour découvrir *in situ* toute cette fonge qui n'est pour moi, aujourd'hui, que séquences d'ADN nucléotidiques...

Je tiens également à remercier Sylvain SANTONI sans qui l'étude de métagénomique n'aurait pu être réalisée ; ses conseils et son aide ont été précieux.

Mes remerciements s'adressent également à Frédéric MAHE pour son aide dans la longue analyse primaire des données de séquençage Illumina.

Mes remerciements vont également à Madame Roselyne LANNES pour son aide dans les démarches administratives, qui auraient été laborieuses sans elle.

Une pensée amicale va également à Clara, Louise et Benjamin avec lesquels j'ai pu échanger : Merci pour votre bonne humeur, les gâteaux et les différentes activités testées.

Enfin merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce rapport et pour tous les moments conviviaux qu'il m'a été donné de partager.



## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	3
SOMMAIRE .....	5
LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	9
I. Introduction .....	11
II. Matériels et méthodes.....	21
1. Description des sites d'étude .....	21
2. Matériels biologiques.....	21
2.a. Echantillons de bois morts.....	21
2.b. Préparation des broyats et extraction de l'ADN.....	23
3. Séquençage de type Sanger relatif au dispositif de piégeage fongique constitué d'éprouvettes standardisées .....	23
3.a. Amplification par PCR .....	23
3.b. Electrophorèse en gel d'agarose.....	25
3.c. Séquençage Sanger des produits de PCR et analyse des séquences .....	25
4. Métagénomique ciblée à partir de l'ADN extrait des fragments de bois morts du dispositif d'échantillonnage aléatoire : .....	27
4.a. Design des primers de PCR et Préparation de la librairie de séquençage par PCR.....	27
4.b. Séquençage Illumina MiSeq et analyse bio-informatique .....	27
III. Résultats .....	29
1. Dispositif de piégeage fongique : analyse des données de Séquençage Sanger .....	29
1.a. Analyse des produits de PCR sur gel d'électrophorèse .....	29
1.b. Alignement des séquences des produits de PCR et assignation taxonomique .....	31
1.c. Affiliation des OTUs à des lignées fongiques .....	31
1.d. Obtention de séquences et durabilité des bois .....	33
2. Dispositif d'échantillonnage aléatoire de bois mort : analyse des données de séquençage Illumina.....	35
2.a. Contrôle qualité des échantillons d'ADN environnemental .....	35

2.b. Contrôle qualité des produits de PCR .....	35
2.c. Analyse et alignement des séquences .....	37
IV. Conclusion et perspectives .....	39
1.a. Discussion - Conclusion .....	39
1.b. Perspectives : .....	43
V. Références bibliographiques .....	47
ANNEXES .....	51
RESUME.....	61
SUMMARY .....	61

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Différents types de pourriture du bois.....	10
Figure 2 : Représentation schématique des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) 1, ITS2 et 5,8S de l'ADN ribosomal nucléaire. ....	14
Figure 3 : Photographie de la récolte de bois en décomposition sur les quatre sites d'essais (photo J. Beauchêne) .....	20
Figure 4 : Photographies d'un dispositif de piégeage fongique .....	20
Figure 5 : Schéma simplifié des différentes phases d'amplification par PCR. ....	22
Figure 6 : Séquences des amorces ITS1 (ITS1myc) et ITS4 (ITS4 myc) utilisées pour la réaction de PCR. (Gardes et Bruns, 1993).....	22
Figure 7 : Schéma des différentes phases de la réaction d'amplification appliquées au cours de la première PCR nécessaire à la construction de la librairie de séquençage (PCR1) .....	26
Figure 8 : Schéma des différentes phases de la réaction d'amplification appliquées au cours de la seconde PCR requise pour la construction de la banque d'amplification (PCR2) .....	26
Figure 9 : Visualisation sur gel d'agarose (2,5 %).....	28
Figure 10 : Exemples de chromatogramme d'échantillons dans le sens 5'-3' .....	30
Figure 11 : Gel par électro-injection sur fragment analyser <sup>TM</sup> .....	34
Figure 12 : Diagramme de distribution des OTUs en fonction des grands phylums fongique : Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota, Gloromycota et des OTUs non identifiés ou sans résultat de BlastN .....	36
Figure 13 : Diagramme des nombres d'OTUs en fonction des quatre sites .....	36





## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Classe d'emploi des bois (d'après le Guide d'utilisation du bois, <a href="http://www.cndb.org">www.cndb.org</a> ).....	12
Tableau 2 : Localisation et codification des sites de prélèvement des échantillons .....	20
Tableau 3 : Extraits des séquences correspondants aux amorces utilisées lors des PCR1 et PCR2 .....	26
Tableau 4 : Nombre de séquences obtenues en fonction des bois et de leur durabilité.....	32
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats d'absorbance et de concentration d'ADN des échantillons de métagénomique .....	34



**Figure 1 : Différents types de pourriture du bois :** A : Pourriture cubique (champignon indéterminé), B : Pourriture fibreuse (*Trametes versicolor*), C : Pourriture molle (champignon indéterminé)

## **I. Introduction**

### **La biodégradation des bois : des impacts écologiques et économiques conséquents**

La biodégradation du bois est un mécanisme complexe essentiel pour la santé de l'arbre, ainsi qu'un moteur clé du fonctionnement des écosystèmes forestiers par sa contribution au recyclage des éléments dans les sols, notamment du carbone (Seibold *et al.*, 2015 ; Amusant *et al.*, 2014). Toutefois, ses fonctionnements restant mal connus, elle reste intégrée de manière très schématique dans la modélisation du cycle du carbone (Cramer *et al.*, 2001 ; Cornwell *et al.*, 2008). L'identification et les rôles des agents microbiens, bactériens et fongiques, impliqués dans la biodégradation du bois font l'objet d'un nombre croissant de travaux de recherche. Ainsi, ces études permettent maintenant de mieux cerner les impacts des pratiques forestières sur la biodégradation du bois et de proposer des modèles de gestion qui intègre la séquestration du carbone dans les écosystèmes forestiers (Colin et Derrière, 2005).

L'étude de la résistance des bois à la biodégradation est également essentielle pour les industries de la filière du bois : la place de ce matériau est en effet croissante dans de nombreux domaines, dont la construction. La dégradation microbienne du bois par les bactéries et les champignons est alors considérée comme la menace économique la plus sensible sur le long terme. Dans ce contexte, il est donc essentiel de caractériser les agents biotiques et leurs fonctionnements pour prévenir, détecter et évaluer le degré de dégradation du bois, mais également proposer de nouveaux procédés écologiquement responsables afin d'accroître la durabilité des bois mis en service.

### **Dégradation du bois par les champignons lignivores et durabilité des bois**

En termes d'écologie, il convient de bien différencier, d'une part les champignons lignicoles qui se développent sur le bois sans dégradation de ses constituants, et d'autre part les champignons lignivores qui s'attaquent aux constituants majoritaires du bois, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ces champignons génèrent alors par hydrolyse enzymatique, un phénomène dit « de pourriture » qui correspond à une détérioration structurelle profonde et irréversible des propriétés du bois. Il en résulte une altération des propriétés mécaniques, physiques, chimiques et esthétiques du bois ainsi qu'une perte de résistance mécanique du bois. On distingue alors trois types de pourritures : la pourriture cubique ou pourriture brune (Basidiomycètes), la pourriture fibreuse ou pourriture blanche (Basidiomycètes) et la pourriture molle (Ascomycètes et Deutéromycètes) (Figure 1). Les champignons lignivores ne constituent donc, aucunement, un groupe phylogénétiquement homogène, mais un groupe fonctionnel réparti dans de très nombreux taxons.

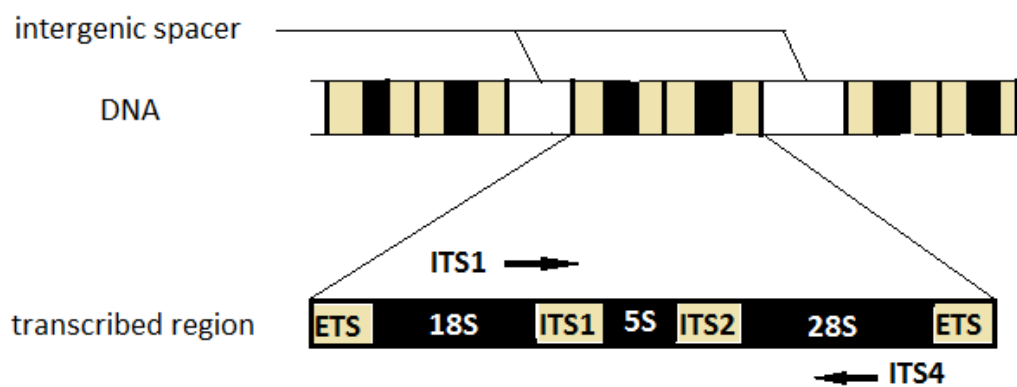
**Tableau 1 : Classe d'emploi des bois (d'après le Guide d'utilisation du bois, [www.cndb.org](http://www.cndb.org)), (classe de durabilité naturelle 1 : très peu durable, moins de 5 ans - classe de durabilité naturelle 5 : très durable, plus de 25 ans)**

Classes	Situation en service	Exemples d'emplois	Zone sensible	Risques biologiques
1	- Bois sec - Humidité toujours inférieur à 20 %	Menuiseries intérieures : parquets, escaliers, portes ...	2 mm	- Insectes - Termites
2	- Bois sec - Humidité occasionnellement supérieur à 20 %	Charpente, ossature correctement ventilée en service	2 mm	- Insectes - Champignons de surfaces - Termites
3	- Humidité fréquemment supérieur à 20 %	Toutes pièces de constructions ou menuiseries verticales soumises à la pluie : bardages, fenêtres...	Toute la partie humidifiable de la zone non durable naturellement	- Pourriture - Insectes - Termites
4	- Humidité toujours supérieur à 20 %	Bois horizontaux en extérieur (balcon) et bois en contact avec le sol ou une source d'humidification prolongée ou permanente	Zone non durable naturellement	- Pourriture - Insectes - Termites
5	- Bois en contact permanent avec l'eau de mer	Piliers, pontons, bois immergé	Zone non durable naturellement	- Pourriture - Insectes - Térébrants marins

Selon l'essence considérée, le bois matériau peut, quant à lui, être naturellement plus ou moins sensible à son environnement biotique ; la filière bois a ainsi défini 5 classes d'emploi des bois fondées sur une méthode normalisée d'estimation de leur durabilité vis-à-vis des pourritures fongiques, la norme NF EN 335-1 à 3. Les espèces de bois sont ainsi conventionnellement réparties en cinq classes de durabilité (Tableau 1), ce qui permet de les choisir en fonction de leur utilisation.

### **Diversité taxonomique des champignons**

La connaissance des champignons des zones tempérées est plus ancienne et développée qu'en zones tropicales. Toutefois, au cours des deux dernières décennies, la mycologie tropicale a bénéficié des techniques de séquençage Sanger et NGS pour l'exploration de la diversité de ces écosystèmes (e.g. Courtecuisse *et al.*, 2012 ; Bordez *et al.*, 2016). En plus des études de la diversité taxonomique, des approches fonctionnelles sont également menées. Nombre d'études ont été motivées par une volonté de description des espèces pour leur préservation et leur conservation face à l'évolution de l'habitat ou la destruction de zones forestières naturelles induisant une érosion conséquente de la biodiversité (Yamashita *et al.*, 2015 ; Kerfahi *et al.*, 2016). Les conditions d'échantillonnage conditionnent alors l'estimation de la diversité des communautés fongiques étudiées (Yamashita *et al.*, 2015). Il apparaît que les conditions environnementales biotiques et abiotiques (pente, humidité relative, température du sol, profondeur et composition de la litière, qualités de la canopée, contenu en eau du sol) affectent de manière sensible la composition des communautés fongiques (Gomez-Hernandez *et al.*, 2012, Dighton *et al.*, 2005). Gibertoni *et al.* (2016) ont comparé la distribution des champignons polypores dans trois centres d'endémisme en Amazonie brésilienne. Sur 153 espèces de polypores récoltées, une analyse de similarité basée sur un test de Bray-Curtis n'a pas permis de mettre en évidence de différence de diversité fongique entre ces centres de diversité. Urbina *et al.* (2016) se sont attachés à étudier la diversité fongique dans les sols de différents écosystèmes de Porto Rico. Pour mener cette étude, les auteurs ont utilisé une méthode de séquençage massif leur permettant de produire 566 613 séquences qu'ils ont groupées en 4 140 Unités Moléculaires Taxonomiques opérationnels (OTUs). Ils démontrent ainsi que les populations fongiques sont structurées en fonction des écosystèmes, avec une dominance d'Ascomycètes et de Basidiomycètes. Pour ce dernier groupe, les communautés sont dominées par des décomposeurs et des champignons ectomycorhiziens. Les études de la structuration des communautés fongiques ne permettent pas encore de comprendre les mécanismes de cette structuration (Dighton *et al.*, 2005).



**Figure 2 : Représentation schématique des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) 1, ITS2 et 5,8S de l'ADN ribosomal nucléaire.** Les flèches noires représentent les amorces utilisées en écologie moléculaire des champignons.  
ETS : « External Transcribed Spacer »

## **Caractérisation moléculaire des espèces fongiques**

Le concept d'espèce en mycologie est en évolution continue (Taylor *et al.*, 2000 ; Lutzoni *et al.*, 2004 ; Blackwell, 2011 ; Hibbett *et al.*, 2011), notamment grâce aux méthodes d'analyses des génomes. En effet l'étude des isolats prélevés *in situ* a longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats en culture pure et une classification basée sur des critères phénotypiques (nécessitant l'observation de fructifications très aléatoires à obtenir) et biochimiques. Ces méthodes classiques fondées sur la description de caractères morphologiques et anatomiques sont incontournables mais limitées par le caractère cultivable ou non des isolats ; elles ont longtemps restreint la caractérisation et l'exploration de la diversité des communautés fongiques. Ces méthodes sont désormais complétées par les techniques de biologie moléculaire, permettant une meilleure appréhension de la taxonomie et de la phylogénie de ces organismes (Lutzoni *et al.*, 2004 ; Hibbett *et al.*, 2011). Aujourd'hui, l'analyse de l'opéron ribosomique permet une caractérisation suffisante pour reconnaître la plupart des taxons fongiques.

L'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis le séquençage des portions ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer) encadrant le gène 5.8S de l'ADN ribosomal (ADNr) nucléaire avec des amorces spécifiques des champignons, sont des outils très largement utilisés pour la caractérisation moléculaire des champignons (Figure 2). Ces séquences permettent d'une part de constituer des groupes d'homologie ou Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) à différents niveaux taxonomiques moléculaires (espèce, genre, famille, ordre, classe et phylum au sens moléculaire) et d'autre part de détecter les parentés et reconstruire la phylogénie de ces organismes (Li et Godzick, 2006). La technique est utilisable dans de nombreuses situations : cultures de souches pures identifiées, sporophores de spécimens frais ou d'herbier, échantillons de mycélium indéterminé prélevé *in situ*, ou encore directement dans des échantillons de bois infectés par des champignons (Zaremski *et al.*, 2005).

## **Les techniques méta-omiques et l'étude de la composante fongique des microbiotes des écosystèmes forestiers.**

La contribution récente d'outils moléculaires de séquençage à haut débit (approche méta-omics, NGS) apporte aujourd'hui un nouvel éclairage pour l'étude de la diversité taxonomique, l'écologie et le rôle des communautés microbiennes. Elle conduit, en particulier, à des changements de paradigmes et de nouveaux concepts.

Ainsi la théorie de l'hologénome (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2011) et le concept d'holobionte sont actuellement au cœur de nombreuses réflexions et débats sur le fonctionnement, l'homéostasie des organismes ou leur évolution. La notion d'holobionte a en effet étendu la notion d'organisme à l'ensemble des communautés microbiennes internes ou de surface qui lui est associé.





Ces organismes seraient alors considérés comme des communautés d'espèces, « métaorganismes » qui seraient la véritable unité d'évolution, résultat de l'interaction de leur propre génome avec celui de leur microbiote et cible de la sélection naturelle. Le concept de microbiote a généré l'apparition d'autres concepts dérivés, plus spécifiques comme le concept de pathobiome (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014), le concept de virome, ou la notion de résistome. Chez les plantes, le concept de microbiote conduit à rechercher de nouvelles stratégies pour favoriser, notamment, la croissance végétale, la résistance aux maladies ou augmenter la viabilité du végétal par l'étude des assemblages microbiens (Barret *et al.*, 2016).

Les apports de la métagénomique dans l'exploration des microbiotes des écosystèmes forestiers sont également sensibles. Ils permettent en effet de multiplier le maillage et le nombre de prélèvements environnementaux pour s'adapter aux l'hétérogénéités spatiales et temporelles de ces écosystèmes. Nombre de recherches se sont tout d'abord focalisées sur le compartiment bactérien des microbiotes. Grâce aux progrès des technologies de séquençage haut débit et au développement d'outils bio-informatiques dédiées à l'analyse fongique, il est désormais possible d'appréhender la composante fongique des microbiotes, sa structuration, sa dynamique, son interaction avec l'hôte ou les facteurs environnementaux. Ainsi, Tedersoo *et al.* (2014) sur plus d'une centaine d'échantillons de sol provenant d'environnement réparti sur l'ensemble des écosystèmes terrestres de la planète ont pu mettre en évidence l'importance des facteurs climatiques, édaphiques et spatiaux dans l'organisation et notamment la richesse spécifique des communautés fongiques ; la richesse fongique s'avérant déconnectée de la diversité floristique. Les méthodes NGS (Next-Generation Sequencing) utilisant des séquences plus courtes qu'avec les techniques Sanger par exemple, réduite à la portion ITS2, la précision taxonomique est moindre. Toutefois, cette réduction de la précision taxonomique est compensée par une abondance de séquences, souvent plusieurs centaines de milliers. Ces méthodes permettent également de mettre en évidence les éventuelles variations de séquences des différentes copies des ITS au sein d'un même individu (Urbina *et al.*, 2016, Bordez *et al.*, 2016).

### **Les champignons lignivores de Guyane**

La Guyane française se situe en région amazonienne. Avec une forêt qui couvre 80% de son territoire, elle constitue le plus grand massif forestier et la plus grande forêt tropicale au sein de l'Union européenne. Même si des travaux récents ont permis l'identification de nouvelles espèces de champignons en Guyane (Horak et Cheype, 2007 ; Cheype et Campo, 2012 ; Cheype, 2015), la diversité fongique de Guyane est encore très mal connue. En effet, Courtecuisse *et al.* (2012) ont estimé le nombre d'espèce de champignons à 25 000 espèces et seules 3% sont décrites ; nos connaissances de la diversité des champignons lignocellulolytiques de Guyane sont encore très fragmentaires.



## **Objectifs de notre étude et approche méthodologique retenue**

Notre étude cible trois objectifs :

Contribuer à la description de la diversité des champignons lignocellulolytiques des communautés fongiques des sols forestiers de Guyane.

Etudier la structuration des communautés fongiques lignocellulolytiques et les patrons de diversité en fonction de l'environnement forestier de prélèvement.

Identifier et analyser les associations fongiques lignocellulolytiques en fonction de la durabilité des bois échantillonnés dans un même écosystème.

Pour atteindre ces objectifs, un dispositif de terrain a été mis en place. Des échantillons de bois de différentes espèces présentant des durabilités naturelles variables ont été placés dans les sols de différents écosystèmes forestiers guyanais pendant des durées variables. Sur ces échantillons, un fragment de bois infecté servira à l'extraction de l'ADN total suivant la méthode décrite par Zaremski *et al.* (2005). Les ADNs totaux extraits serviront ensuite à l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec des amorces ciblées sur les espaceurs internes transcrits ribosomiaux (ITS ; Zaremski *et al.*, 2006). Les séquences obtenues seront comparées aux banques de données moléculaires internationales (notamment NCBI et DDJB) à l'aide de l'algorithme BlastN (Altschul *et al.*, 1997) puis replacées dans un arbre phylogénétique afin de préciser les positions taxonomiques des différentes séquences.

Les variations de composition des communautés fongiques ainsi caractérisées seront analysées afin de définir une éventuelle structuration de ces communautés en fonction de l'espèce de bois et de sa durabilité naturelle, de l'écosystème dans lequel a évolué l'échantillon et si cela est possible, en fonction de l'interaction entre la durabilité naturelle du bois et de l'écosystème. Les analyses des données seront réalisées dans l'environnement R (R Development CoreTeam, 2011).

**Tableau 2 : Localisation et codification des sites de prélèvement des échantillons**

Code utilisé	Localisation	Position GPS	Substrat
A :	Plateau	5°15'58.2"N 52°55'30.6"W	Sableux
B :	Bas Fond	5°15'56.2"N 52°55'29.8"W	Sableux
C :	Plateau	5°16'09.3"N 52°55'41.4"W	Latéritique
D :	Bas Fond	5°16'07.2"N 52°55'44.4"W	Latéritique



**Figure 3 : Photographie de la récolte de bois en décomposition sur les quatre sites d'essais (photo J. Beauchêne)**



**Figure 4 : Photographies d'un dispositif de piégeage fongique, sur sol latéritique (A) et sableux (B) à Paracou, Guyane (Photo J. Beauchêne)**

## II. Matériels et méthodes

### 1. Description des sites d'étude

Le matériel biologique étudié a été récolté dans le parc forestier de Paracou, implanté sur la commune de Sinnamary en Guyane française. Le dispositif d'étude inclut 4 sites forestiers répartis :

- D'une part sur les deux principaux types de sol guyanais : sol latéritique et sol sableux
- Et d'autre part dans deux situations hydrologiques différentes : le plateau et le bas-fond.

Ces quatre sites sont géo-localisés par leurs coordonnées GPS et référencés A, B, C et D dans la suite de l'étude (Tableau 2).

### 2. Matériels biologiques

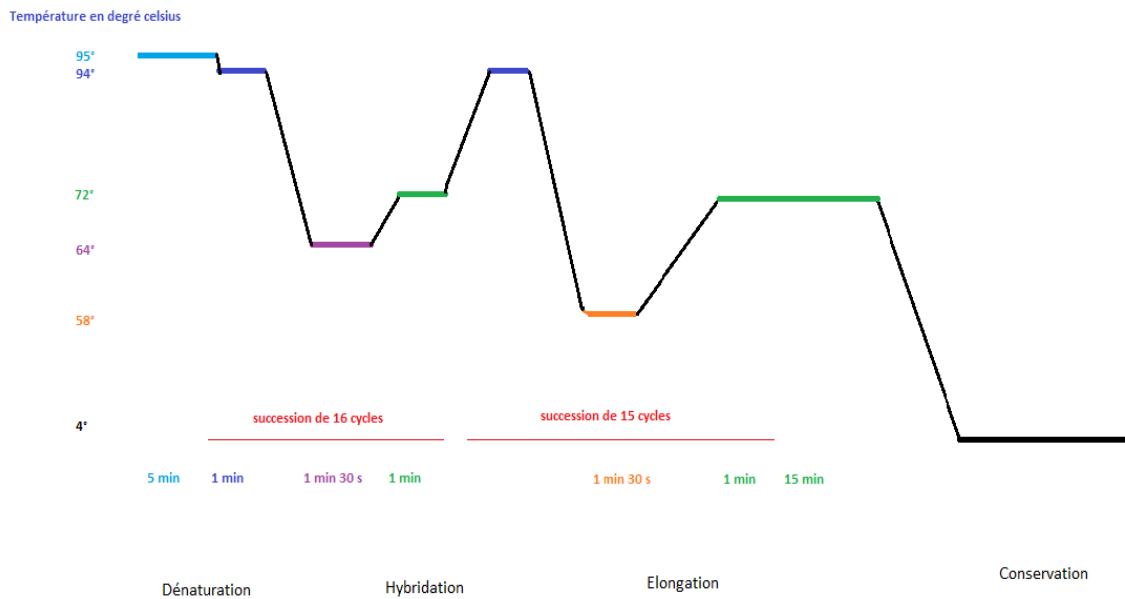
#### 2.a. *Echantillons de bois morts*

*Dispositif d'échantillonnage aléatoire de fragments de bois morts* - Dans une première approche, sur chacun de ces 4 sites, cent fragments de bois d'essences indéterminées ont été prélevés de façon aléatoire au sol afin de caractériser la diversité du « ligniocellulobiome », soit l'ensemble des champignons potentiellement impliqués dans la dégradation des bois. Les morceaux de bois sont séchés à 40 °c dans une étuve durant une semaine. L'ensemble des 100 échantillons d'un site est par la suite broyé à l'aide d'un broyeur Restch SM200 en maille 2 mm, dans le but d'obtenir une poudre de bois à partir de laquelle une extraction de l'ADN total puis son étude moléculaire par séquençage ciblé de type Illumina seront réalisées (Figure 3).

*Dispositif de piégeage fongique constitué d'éprouvettes standardisées* - Dans une deuxième approche, nous avons exploité un dispositif de dégradation contrôlée des bois mis à notre disposition par J. Beauchêne en Guyane. Selon ce dispositif, des éprouvettes standardisées de bois mort, de 7 cm de longueur sur 1 cm de largeur et 0.5 d'épaisseur, ont été incubées *in situ* sur chacun des 4 sites d'étude (Figure 4). Les incubations ont été réalisées sur des durées de 1, 2, 3, 4 et 5 mois, à deux périodes de l'année, une période sèche et une période humide, entre 2009 et 2010.

Les éprouvettes sont par ailleurs représentatives de 10 espèces ligneuses forestières, choisies en fonction de la durabilité de leur bois. Les espèces étudiées et les caractéristiques de durabilité de chacune d'elles sont présentées dans l'Annexe 1.

Ces éprouvettes peuvent être considérées comme des dispositifs de piégeage (ou des filtres de recrutement) des communautés lignocellulolytiques propres à chaque espèce de bois étudiés. A l'issue des périodes d'incubation, le matériel biologique récolté est donc constitué des éprouvettes de bois mort potentiellement infestées de mycéliums indéterminés.



**Figure 5 : Schéma simplifié des différentes phases d'amplification par PCR.** Il comprend : - une phase de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, - suivie par 16 cycles constitués chacun d'une phase à 94°C pendant 1 min, 64°C durant 1 min 30 s puis 72°C pendant 1 min, - Suivi par 15 cycles constitués chacun d'une phase de 1 min à 94°C, 1 min 30 s à 58°C puis 1 min à 72°C – et enfin une phase finale d'élongation à 72°C pendant 15 minutes.

Chaque amplification est réalisée dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant : 5 µl de la solution d'ADN à amplifier, 25 µl de tampon 2X du kit Master Mix Multiplex Qiagen ® incluant la Taq polymérase et les dNTP, 0.5 µl de chacune des amorces fongiques et 19 µl d'eau stérile.

Des témoins sans ADN matrice sont inclus dans chaque plaque d'amplification afin de tester la présence éventuelle d'ADN contaminants dans nos réactifs. Les produits de PCR sont conservés à -20°C dans l'attente de la réalisation des gels de contrôle et de leur envoi pour le séquençage.

ITS1 myc (F) : 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'  
ITS4 myc (R) : 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

**Figure 6 : Séquences des amorces ITS1 (ITS1myc) et ITS4 (ITS4 myc) utilisées pour la réaction de PCR. (Gardes et Bruns, 1993)**

L'analyse porte, au total, sur quatre cents éprouvettes (4 sites X 10 espèces de bois X 2 périodes d'incubation X suivi mensuel sur 5 mois) qui feront chacune l'objet d'une extraction de l'ADN total, d'une amplification par PCR des ITS fongiques, du séquençage des produits PCR et de l'analyse des séquences par BlastN, la constitution d'OTUs et leurs assignations à des lignées puis d'une analyse de l'ensemble du jeu de données sous R.

### *2.b. Préparation des broyats et extraction de l'ADN*

Pour les deux dispositifs d'étude de la dégradation des bois (dispositif d'échantillonnage aléatoire ou dispositif de piégeage fongique sur éprouvettes standardisées), les fragments de bois font l'objet d'un broyage mécanique grossier, à l'aide d'une râpe métallique, ou d'un broyeur électrique. La poudre de bois est alors stockée dans des tubes Falcon stériles à 5°C pour une utilisation ultérieure. Une partie de la poudre est ultérieurement reprise pour être broyée plus finement dans l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier de marbre, afin de rompre mécaniquement les parois végétales.

Les extractions d'ADN sont ensuite effectuées suivant une adaptation du protocole décrit par Zaremski *et al.* (2005) indiqué dans l'Annexe 2 : elles portent notamment sur 300 mg de poudre de bois et non plus 30 ou 60 mg.

Les concentrations en ADN présent dans les différents échantillons sont, dans un premier temps toutes contrôlées par dosage fluorométrique à l'aide du Kit Invitrogen TM Qubit ® Assays.

## 3. Séquençage de type Sanger relatif au dispositif de piégeage fongique constitué d'éprouvettes standardisées

### *3.a. Amplification par PCR*

Les extractions réalisées conduisent à un mélange d'ADN de bois et d'ADN fongique. Afin de cibler spécifiquement l'ADN fongique, les régions ITS1 et ITS2 (intergenic transcribed spacer) encadrant le gène 5,8S de l'ADN ribosomal (ADNr) nucléaire fongique sont amplifiées par PCR selon le programme décrit à la Figure 5, en utilisant les amorces fongiques ITS1 et ITS4 (Figure 6 ; Grades et Bruns, 1993 ; White *et al.*, 1990).





### 3.b. Electrophorèse en gel d'agarose

Un aliquote de 8 µL des produits d'amplification obtenus sont soumis à une migration sur gel d'agarose (Seakem® LE Agarose Larza) à 2,5 %, dans un tampon TAE (tris Acétate EDTA) 1X à 110 volts. Chaque puits est donc chargé de 8 µl de produits de PCR et 3 µl de bleu de charge (6XDNA loading). Le marqueur de taille Quick-load® 2-log DNA est utilisé. Le témoin positif utilisé est *Gloeophyllum trabeum* ; le témoin négatif est constitué d'eau ultra pure.

L'intensité de la réaction de PCR, l'intégrité et la taille des fragments d'ADN amplifiés sont évalués après révélation des produits migrés au Bromure d'Ethydium (BET) pendant 15 minutes suivie d'un lavage à l'eau pendant 5 min. et observés sous lumière UV (590 nm).

### 3.c. Séquençage Sanger des produits de PCR et analyse des séquences

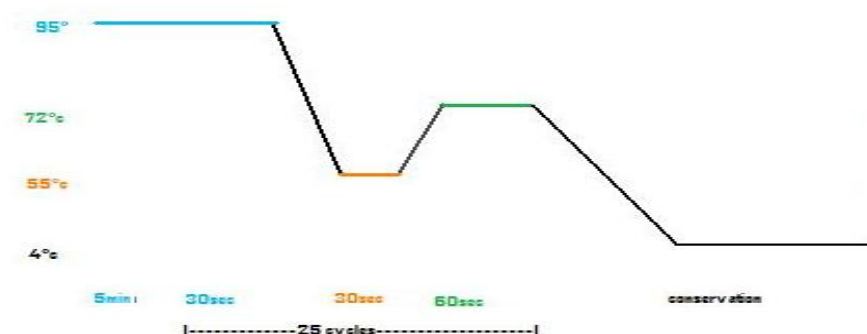
Après validation de leur qualité sur gel d'agarose, les produits de PCR sont envoyés pour séquençage, au laboratoire Genoscreen de Lille. (<https://www.genoscreen.fr/fr/>). Le séquençage est réalisé par une méthode automatique d'analyse de séquences de type Sanger, basée sur la détection de la fluorescence de dNTP terminator.

Nous avons exclusivement analysé pour ce mémoire les séquences forward (sens 5'-3' de lecture des séquences d'ADN). Elles sont éventuellement corrigées manuellement à partir des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS afin d'éliminer les bases non attribuées (N) ou pour lesquels subsiste un doute (R, Y, S, W, K, M, B, D, H ou V). Elles sont ensuite comparées avec les séquences de la base de données GenBank du NCBI grâce à l'algorithme BlastN (basic Alignment and Search Tool nucléotide, Altschul *et al.*, 1997). En fonction du résultat de BlastN, la séquence peut être assignée à un groupe taxonomique (OTU, lignée, espèce au sens moléculaire, etc.).

Le logiciel BioEdit nous permet par la suite d'éditer et aligner les séquences, qui sont alors regroupées en OTU, basées sur une similarité de 97% entre les séquences d'une même OTU, grâce au serveur web CD-HIT (Smith *et al.*, 2013). Ces séquences sont alors regroupées en fonction de leurs liens phylogénétiques à partir du site RDP. Les OTUs ont également été assignées à des lignées fongiques en référence à la banque de données du NCBI en suivant le système de nomenclature décrit par Tedersoo *et al.* (2010) qui prend en compte les connaissances concernant l'écologie des champignons.

**Tableau 3 : Extraits des séquences correspondants aux amorces utilisées lors des PCR1 et PCR2 et détaillées dans l'Annexe 3**

PCR 1 - Primers ciblant les régions ITS	Primers
ITS1FI2	5'GAACWGC GGARGGATCA 3'
ITS2	5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'
PCR2 - Nextera Index	Primers
Index 1 Read	5'CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG 3'
Index 2 Read	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTGGCAGCGTC 3'



**Figure 7 :** Schéma des différentes phases de la réaction d'amplification appliquées au cours de la première PCR nécessaire à la construction de la librairie de séquençage (PCR1), avec une phase d'hybridation à 55°C (température optimale pour l'enzyme Kapa HiFi). La réaction est réalisée dans un volume final de 25 µl. Le mélange réactionnel inclut 100 ng d'ADN, les primers forward et reverse ajoutés à une concentration finale de 10 pmol et 12,5 µl d'enzymes Kapa HiFi 2 x.



**Figure 8 :** Schéma des différentes phases de la réaction d'amplification appliquées au cours de la seconde PCR requise pour la construction de la banque d'amplification (PCR2). La réaction de PCR2 est effectuée sur les produits d'amplification de la PCR1 qui reçoivent une combinaison de primers forward et reverse (i7 et i5 dans Illumina index oligo). Le mélange réactionnel inclut 12,5 µl de Kappa HiFi 2X, 2,5 µl de primers Illumina i5, 2,5 µl de primer Illumina i7 et 2,5 d'eau pour un volume final de 20 µl.

#### 4. Métagénomique ciblée à partir de l'ADN extrait des fragments de bois morts du dispositif d'échantillonnage aléatoire :

##### *4.a. Design des primers de PCR et Préparation de la librairie de séquençage par PCR*

Les primers ITS1FI2 et ITS2 sont utilisés afin d'amplifier la portion d'ADN fongique ITS1 (Tableau 3). La préparation des banques de séquençage Illumina Miseq inclue deux étapes de PCR. La première étape (PCR1 ; Figure 7) est conçue pour amplifier la cible ITS1 et ajouter la séquence Illumina Nextera transposase (Tail Illumina).

Les primers forward et reverse de la PCR1 sont par ailleurs allongés avec une séquence de frame shift (FS), qui permet d'améliorer la diversité des séquences et la qualité de lecture. Pour chaque cible des régions du gène ribosomique, trois types de primers forward de la PCR1 sont ainsi conçus, contenant respectivement pour (FS1) 6, (FS2) 5 et (FS3) 4 nucléotides aléatoires basés sur les séquences FS (Annexe 3). Ils sont ajoutés en ratio équimolaires lors de la PCR1.

La réaction de PCR2 (Figure 8) est effectuée sur les produits d'amplification de la PCR1 qui reçoivent une combinaison de primers forward et reverse (i7 et i5 dans Illumina index oligo : Tableau 3), spécifiques d'Illumina, qui permettent d'ajouter un système à double index afin de marquer et identifier les quatre sites d'étude de nos échantillons et de fixer les séquences à la flow-cell.

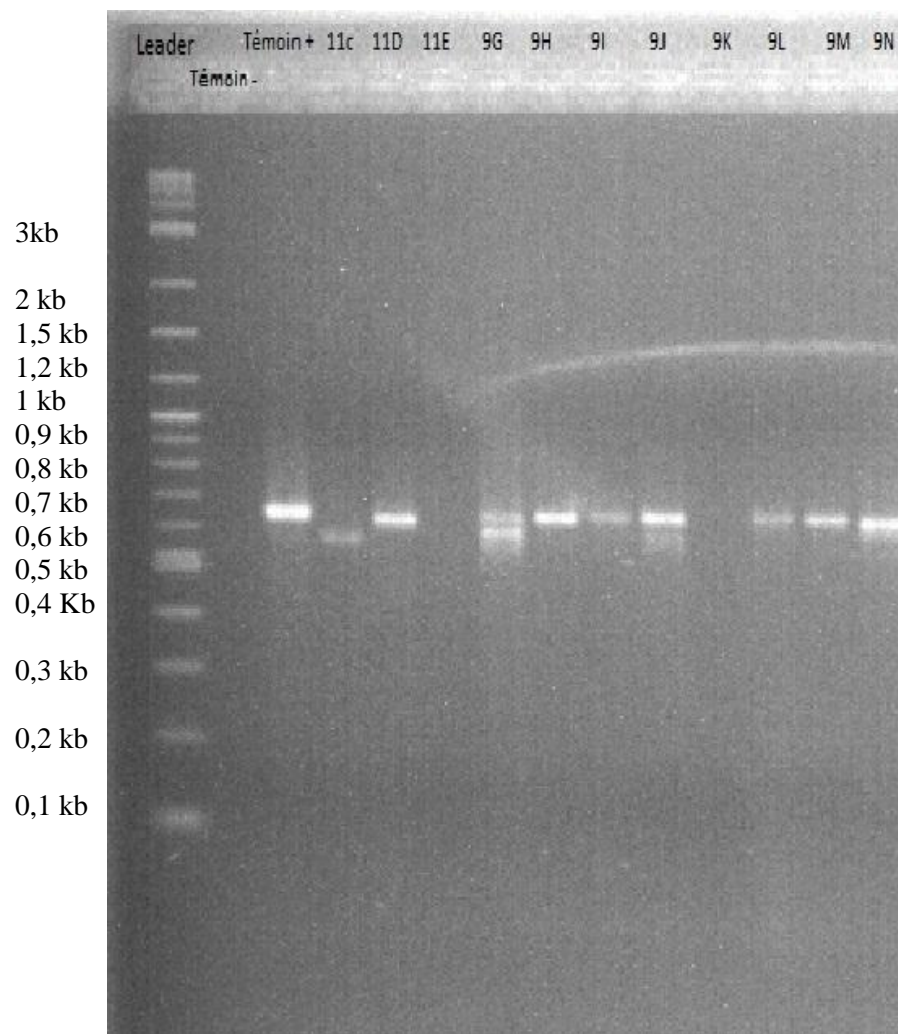
Les produits d'amplifications PCR1 et PCR2 sont purifiés sur billes magnétiques, puis contrôlés sur gel par électro-injection (Fragment Analyseur).

La quantité de fragments de séquences PCR2 obtenue est quantifiée par q-PCR, afin d'estimer la quantité de fragments d'ADN déposée sur la flow-cell et de préparer les plaques Illumina MiSeq pour le séquençage.

##### *4.b. Séquençage Illumina MiSeq et analyse bio-informatique*

Le séquençage est réalisé sur nano plaques Miseq de 2x250 pb ou 2x300 pb sur séquenceur Illumina Miseq.

Le traitement primaire des données brutes est réalisé par Frédéric Mahé (CIRAD LSTM) afin de nous fournir les fichiers filtrés, nettoyés pour la création des OTUs, et l'assignation taxonomique des OTUs.



**Figure 9 :** Visualisation sur gel d'agarose (2,5 %), en lumière UV, des produits de PCR obtenus, avant séquençage Sanger, à partir d'échantillons environnementaux du dispositif de piégeage fongique par éprouvettes de bois

Ladder : Quick-load® 2-log DNA, témoin négatif (puits 1) - Témoin positif *Gloeophyllum trabeum* (puits 2) – Puits 3 à 13 : échantillons environnementaux.

### III. Résultats

#### 1. Dispositif de piégeage fongique : analyse des données de Séquençage Sanger

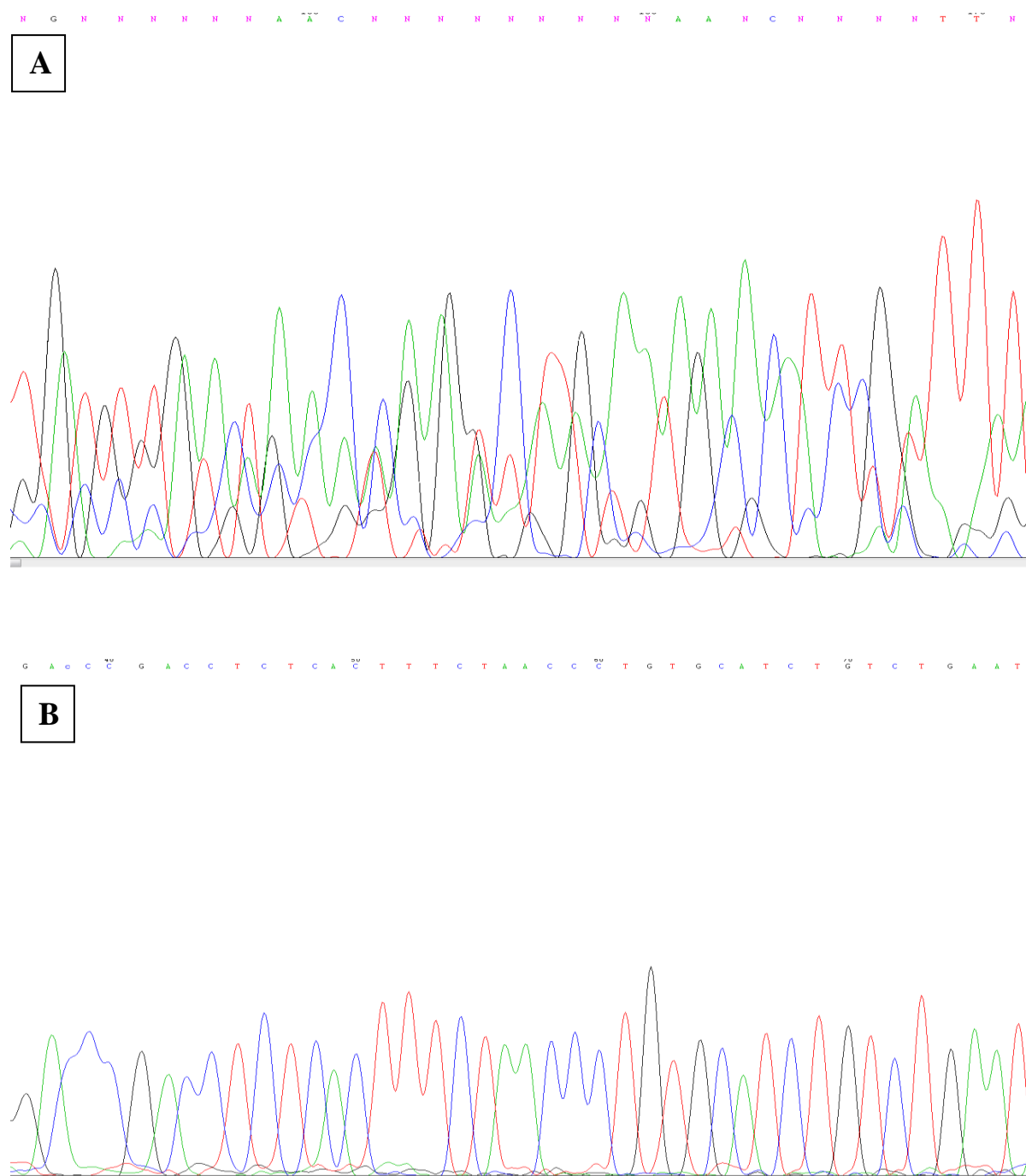
##### *1.a. Analyse des produits de PCR sur gel d'électrophorèse*

L'examen des gels d'électrophorèse met en évidence une dégradation partielle de l'ADN environnemental à l'issue du protocole d'extraction. Les concentrations en ADN étant néanmoins suffisante, comprise entre 1,96 ng/μl et 141 ng/μl, la PCR a été jugée réalisable.

Au cours de cette étude, 400 réactions de PCR ont ainsi été conduites correspondant aux 400 éprouvettes de bois du dispositif de piégeage fongique.

L'étude des profils de migration de l'ADN amplifié par PCR met en évidence la présence d'un fragment d'ADN d'environ 650 pb pour la majorité des échantillons traités (Figure 9) ; ces observations, conformes aux résultats attendus, confirment le caractère amplifiable des extraits d'ADN obtenus à partir de fragments de bois selon le protocole établi.

Certains échantillons ont cependant généré des bandes multiples sur les gels d'électrophorèse : une amplification partielle d'ADN végétal ou la présence simultanée de plusieurs champignons peuvent expliquer ces observations. L'absence de bande a également été parfois observée. Trois cas sont à envisager : - des fragments d'ADN trop courts en amont de la PCR, car dégradés durant les différentes phases d'extraction, ou - la présence de polyphénols, molécules nombreuses dans le bois en décomposition, structurellement proches de l'ADN et se fixant sur le site actif de la polymérase et bloquant ainsi l'amplification de l'ADN, ou – l'absence de champignons dans les bois les plus résistants (classes 4 et 5).



**Figure 10 : Exemples de chromatogramme d'échantillons dans le sens 5'-3'.** (A) superposition d'au moins deux séquences, (B) séquence interprétable avec un léger bruit de fond.

### *1.b. Alignement des séquences des produits de PCR et assignation taxonomique*

Parmi les produits de PCR en notre possession, 94 d'entre eux ont été envoyés à Genoscreen.

Sur les 94 échantillons séquencés dans le sens ITS1 (5'-3'), trois d'entre eux n'ont pas permis d'obtenir de séquence. 59 séquences ont révélé deux à quatre signaux, (pics superposés). 32 séquences sont exploitables, directement ou après correction à partir de l'électrophorégramme (Figure 10).

L'alignement de séquences à partir d'un segment conservé d'environ 100 bp permet de générer 16 OTU à un seuil de 97 % d'homologie. On relève 7 OTUs singleton (OTUs composées d'une seule séquence) représentant 56,25 % et une OTU regroupant 8 séquences (Annexe 4).

L'assignation taxonomique des OTUs à des taxons fongiques par interprétation des résultats de RDP (Ribosomal Database Project) révèle : 28,1 % de Zygomycètes avec 9 séquences apparentées au genre *Umbelopsis*, 18,8 % apparentées aux Basidiomycètes (5 séquences sans plus de précision et une appartenant à la classe des Agaricomycètes), 28,1 % apparentées aux Ascomycètes, 2 séquences apparentées au genre *Candida* (ordre des Saccharomycetales), 3 séquences apparentées à la classe des Eurotiomycètes, dont 2 appartenant à la famille des Herpotrichiellaceae, ainsi qu'une séquence de *Penicillium* et 4 séquences assignées uniquement au niveau du phylum Ascomycota et enfin 8 séquences de champignons non assignables, soit 25 %.

### *1.c. Affiliation des OTUs à des lignées fongiques*

Les 16 OTUs ont été assignées à 9 lignées fongiques : */exophiala* (1 OTU), */helotiales* (4 OTUs), */mucorales* (3 OTUs), */tremellales* (2 OTUs), */penicillium* (1 OTU), */tricholomataceae* (1 OTU), */sporidiobolales* (1 OTU), */saccharomycetales* (2 OTUs), */unclassified fungus* (1 OTU), (Annexe 4). Appliqué à un jeu de données environnementales issues de forêt tropicales où la plupart des taxons sont encore inconnus, Nous constatons que nous aboutissons à des lignées de rang systématique différent : Ordre, Famille et Genre. Pour deux séquences, l'affiliation a dû être élargie à la notion de « champignon non classé ». Les données environnementales de forêt tropicales sont peu nombreuses et la plupart des taxons y sont encore inconnus ce qui renvoie l'affiliation à des lignées de niveau taxonomique supérieur.

Tableau 4 : Nombre de séquences obtenues en fonction des bois et de leur durabilité (1 peu durable, 5 très durable).

Bois	Nb séquences	Durabilité
Dg : <i>Dicorynia guianensis</i>	5	5
Va : <i>Vouacapoua americana</i>	2	5
Sa : <i>Simarouba amara</i>	6	5
Sr : <i>Sextonia rubra</i>	2	4
Sg : <i>Symphonia</i> spl	4	3
Cp : <i>Carapa procera</i> ,	3	3
Hf : <i>Hymenolobium flavum</i>	6	3/2
Qr : <i>Qualea rosea</i>	3	2
Eu : <i>Erisma uncinatum</i>	1	1
Vm : <i>Virola michelii</i>	0	1

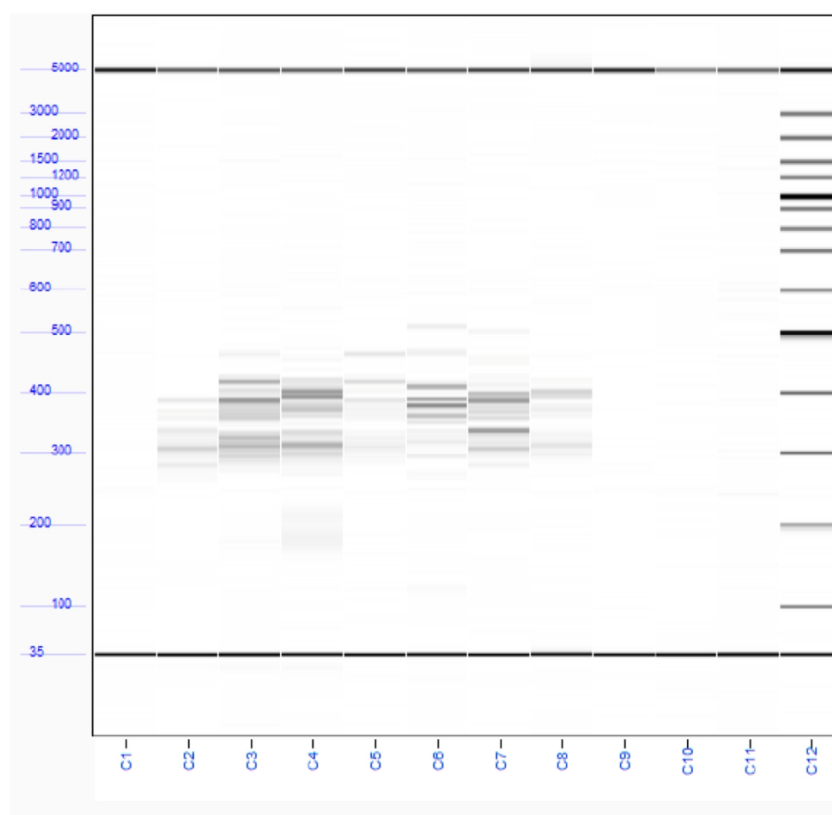


#### *1.d. Obtention de séquences et durabilité des bois*

Les 32 séquences exploitables sont issues de 32 éprouvettes de bois de durabilité variable (Tableau 4). Le nombre de séquences exploitables pour chaque type de bois est récapitulé dans le Tableau 4. Notons qu'aucune séquence n'est affiliée aux échantillons Vm ; ces derniers ont fait l'objet d'attaques de termites pendant leur incubation dans le sol, limitant la récolte et la quantité d'ADN disponible pour une extraction convenable. Ainsi, nous disposons de séquences fongiques issues des différentes éprouvettes (Annexe 5).

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats d'absorbance et de concentration d'ADN des échantillons de métagénomique**, avec 4 répétitions techniques pour chaque site avant purification. (BL : Bas-fond, Latéritique ; BS : Bas-fond, Sable ; PL : Plateau, Latéritique ; PS : Plateau, Sable.)

Echantillon	Concentration	$\lambda$ 260/280 nm	A1 = 260 nm	$\lambda$ 260/230
BL1	25,74 $\mu\text{g/ml}$	1,72	0,8002	0,769
BL2	21,19 $\mu\text{g/ml}$	1,704	0,7206	0,794
BL3	16,37 $\mu\text{g/ml}$	1,726	0,522	0,798
BL4	18,87 $\mu\text{g/ml}$	1,733	0,5895	0,823
BS1	19,52 $\mu\text{g/ml}$	1,522	0,7302	0,644
BS2	12,04 $\mu\text{g/ml}$	1,558	0,4788	0,672
BS3	14,33 $\mu\text{g/ml}$	1,517	0,5549	0,691
BS4	15,23 $\mu\text{g/ml}$	1,568	0,5255	0,712
PL1	12,46 $\mu\text{g/ml}$	1,653	0,3772	0,752
PL2	23,56 $\mu\text{g/ml}$	1,678	0,7709	0,719
PL3	9,17 $\mu\text{g/ml}$	1,691	0,316	0,841
PL4	18,87 $\mu\text{g/ml}$	1,786	0,5966	0,979
PS1	11,76 $\mu\text{g/ml}$	1,617	0,4132	0,733
PS2	9,09 $\mu\text{g/ml}$	1,632	0,399	0,722
PS3	12,33 $\mu\text{g/ml}$	1,582	0,4647	0,683
PS4	8,91 $\mu\text{g/ml}$	1,627	0,3317	0,811



**Figure 11 : Gel par électro-injection sur fragment analyser™.** (Echantillons purs : C1 à C4 - Dilutions au 1/10 : C5 à C8 - Témoin négatif : C9)

## 2. Dispositif d'échantillonnage aléatoire de bois mort : analyse des données de séquençage Illumina

### *2.a. Contrôle qualité des échantillons d'ADN environnemental*

L'adaptation du protocole d'extraction décrit au « Matériels et Méthodes » nous a permis d'extraire les ADN totaux des échantillons environnementaux. La concentration des ADN extraits varie cependant, sensiblement, selon les répétitions techniques pour chacun des différents sites de prélèvement : on relève ainsi des concentrations en ADN comprises entre 25,74 µg/ml et 8,91 µg/ml. Les valeurs de DO moyennes sont les suivantes :  $A1 = 0,54$  ;  $A1/A2 = 1,64$  ;  $A1/A3 = 0,76$

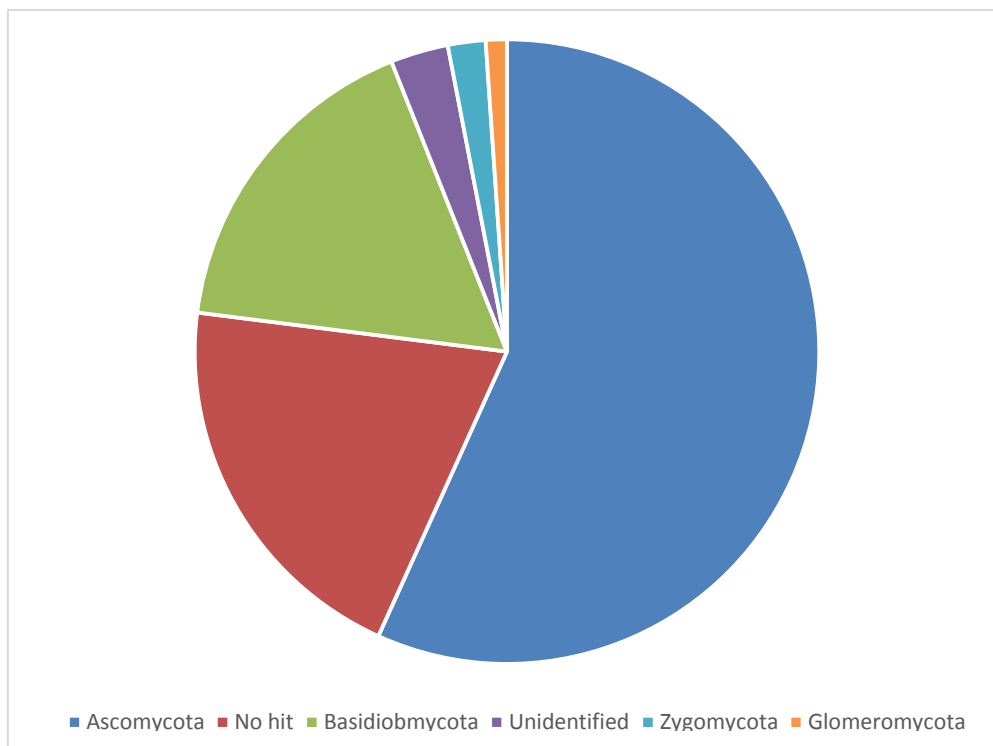
Les valeurs des ratios d'absorbance 260/280 nm, tous inférieurs à 1,8 mettent par ailleurs en évidence un degré de pureté variable des extraits (Tableau 5). Ces résultats nous ont conduits à introduire une étape supplémentaire de purification de l'ADN environnemental sur billes magnétiques.

Les contrôles sur gel d'agarose indiquent une dégradation partielle de l'ADN (données non présentée).

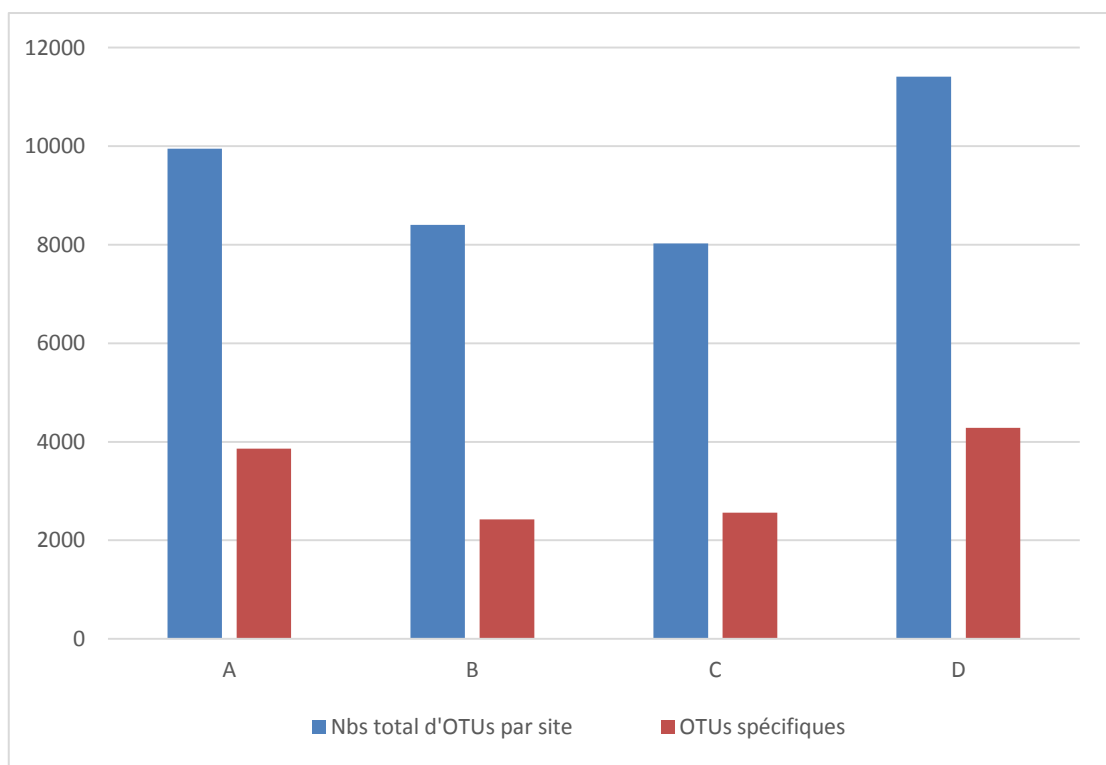
### *2.b. Contrôle qualité des produits de PCR*

Comme attendu, on observe sur les gels d'électrophorèse capillaire par électro-injection (Figure 11), un grand polymorphisme d'ITS amplifiés. On relève également des fragments de plus de 550 bp. Cette observation nous a conduit à abandonner les nano puces 2X250 pour privilégier les 2X300 qui permettent un recouvrement de séquences plus grand.

Pour certains échantillons cependant, les contrôles mettent en évidence une qualité perfectible des produits de PCR (Figure 11). Une phase supplémentaire de purification de l'ADN sur billes magnétiques a également été jugée pertinente (données non présentées) afin d'améliorer la qualité de l'échantillon à amplifier.



**Figure 12 : Diagramme de distribution des OTUs en fonction des grands phylums fongique** : Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota, Gloromycota et des OTUs non identifiés ou sans résultat de BlastN



**Figure 13 : Diagramme des nombres d'OTUs en fonction des quatre sites** : A : BS, B : PS, C : BL et D : PL.

## 2.c. Analyse et alignement des séquences

Le séquençage Illumina a permis d'obtenir 8 484 308 séquences analysables qui ont été répartis dans 22 532 OTUs différents. La courbe de raréfaction établie pour l'ensemble des quatre sites (Annexe 6) nous indique que l'effort de séquençage permet une représentation satisfaisante de la diversité fongique présente dans nos échantillons de bois mort récoltés au sol. Pour chacun des sites, des courbes de raréfaction seront réalisées afin de vérifier que la complémentation de l'échantillonnage est satisfaisant pour chacun des sites.

Ces OTUs appartiennent principalement à quatre phylums fongiques : des Ascomycètes majoritaires représentant 57 %, des Basidiomycètes représentant 17 %, des Zygomycètes 2 % et des Glomeromycètes 1 %. Nous notons aussi la présence dans notre jeu de données de 3 % de séquences non identifiées et d'une proportion de 20% de séquences inconnue (absence de résultat de BlastN). Cette proportion importante de champignons inconnus est la conséquence directe de notre méconnaissance des champignons de Guyane (Figure 12).

Ces données nous permettent également de comparer la distribution des OTUs selon les sites de prélèvement. A ce stade, un test de  $\chi^2$  (non présenté) ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence significative du nombre d'OTUs entre les sites, chiffre qui varie de 8 000 à plus de 11 000 (Figure 13). Nous avons également observé une proportion variable de 29 à 39% d'OTUs spécifique à chacun des sites (Figure 13).

Parmi les OTUs regroupant les Basidiomycètes, nous avons remarqués des genres connus pour être des décomposeurs du bois, notamment : *Ganoderma*, *Gerronema*, *Lentinus*, *Polyporus*, etc.

On retrouve également parmi les Basidiomycètes, des OTUs affiliés à des taxons fongiques connus pour comprendre des espèces ectomycorhiziennes tels que : les *Thelephoraceae*, les *Sebacina*, les *inocybe*, les *Thricholomataceae*, les *Russula* ou encore les *Lactarius*.



## IV. Conclusion et perspectives

### *1.a. Discussion - Conclusion*

#### Biodiversité taxonomique au sein des éprouvettes de piégeage

Lié au traitement d'échantillons de PCR issus d'environnements variables, d'importantes variations de rendement de la réaction de PCR ont été observées avec une part souvent importante de séquences inexploitable. Wintzingerode *et al.* (1997) ont décrit différents mécanismes identifiés comme inhibiteur de la réaction de PCR. Ainsi, en fonction de l'origine d'échantillons environnementaux, des pourcentages de succès de séquençage sont habituellement compris entre 20 % et 50 %. Pour nos échantillons, environ 35 % des séquences ITS1 sont directement exploitables ce qui est donc en accord avec les observations habituellement réalisées. Ce pourcentage de 35 est susceptible d'être augmenté. En effet, les produits PCR doubles, inexploitable en l'état, seront ré-amplifiés par nested-PCR avec des amorces plus spécifiques, notamment l'amorce ITS1b spécifique des Basidiomycètes. L'obtention des séquences reverse est également attendue afin de pouvoir travailler sur des séquences consensus qui offrent toujours une meilleure fiabilité de lecture, notamment quand il est nécessaire de corriger certaines positions.

En Caroline du Nord, O'Brien *et al.* (2005) ont analysé les communautés fongiques de divers sols forestiers. Ils trouvent en moyenne des proportions égales de Basidiomycètes (41 %) et d'Ascomycètes (46 %) qui sont majoritaires ; ils estiment la proportion de Zygomycètes à 1,5 %. En Chine, dans une zone semi-aride de transition entre la forêt et la steppe, Tian *et al.* (2017) trouvent pour leur part des proportions analogues d'Ascomycètes (40 %) et de Basidiomycètes (38 %) et une proportion plus élevée de Zygomycètes (17 %). Bien que le nombre de nos séquences soit encore trop réduit pour calculer des pourcentages fiables, nous observons dans nos échantillons, des proportions équivalentes de Basidiomycètes (8 séquences réparties en 4 OTUS) et d'Ascomycètes (11 séquences réparties en 8 OTUs). Par contre, à ce stade de notre analyse, nous observons une proportion de Zygomycètes (11 séquences réparties en 3 OTUs) beaucoup plus importante. Cette déviation peut être le résultat d'un échantillonnage trop faible et/ou de la distribution en patch des mycéliums dans le sol (Cairney, 2005) ; notre analyse aurait ainsi débutée dans une zone dominée par des Zygomycètes.

Les Basidiomycètes, les Ascomycètes et les Zygomycètes sont connus pour leurs implications dans les pourritures des bois, même s'il semble que les Zygomycètes causent des pertes de masse moindres que les Basidiomycètes et les Ascomycètes (Fukasawa *et al.*, 2011). Les séquences de Zygomycètes que nous avons obtenues ont été positionnées parmi les Mucorales, un des plus anciens groupes de champignons, connus pour être principalement des champignons saprophytiques du sol se développant





donc au profit la matière organique ; des espèces parasites des plantes et des animaux sont également connues dans ce groupe (Hoffmann *et al.*, 2013). L'importance de ce groupe en forêt tropicale amazonienne reste à décrire. Parmi les Ascomycètes, les espèces affiliées aux lignées */penicillium* et */saccharomycetales* sont probablement des champignons lignicoles opportunistes et leurs implications dans la décomposition des bois restent à démontrer. Une OTU a été assignée au genre *Exophiala*. Ce genre communément appelé « levure noire » est connu pour sa capacité unique à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes (pollutions chimiques, hautes températures, milieux pauvres, acide et/ou sécheresse) et aussi pour être un pathogène de l'Homme (Zhao *et al.*, 2010). Cette présence dans nos échantillons indique un rôle probable dans la dégradation du bois, mais également un risque pour la santé des personnels qui manipulent ces champignons. Enfin, parmi les Ascomycètes, nous avons trouvé 4 OTUs affiliées aux Héliotiales. Ce groupe de champignons est connu pour son implication dans la dégradation du bois (Richter et Glaeser, 2015), mais aussi dans le fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne (Tedersoo *et al.*, 2009 ; Lacercat-Didier *et al.*, 2016). Nos connaissances de cet Ordre sont encore très fragmentaires et récentes ; leurs rôles dans le fonctionnement de la forêt guyanaise méritent largement d'être approfondis. Les Basidiomycètes sont certainement les mieux connus pour leurs implications dans la dégradation du bois ; cette capacité serait apparue dans ce groupe il y a 295 MA (Eastwood, 2014). A cela, il convient d'ajouter que la présence de sporophores est une aide précieuse qui a permis le développement de leur étude avant l'apparition des méthodes moléculaires. Dans nos échantillons, 2 OTUs affiliées aux Tremellales ont été trouvées. Cet Ordre, dont certaines espèces lignivores sont cultivées commercialement, comme *Tremella fuciformis* en Chine, comprend de nombreuses autres espèces connues pour leur implication dans la dégradation du bois. Dans un article récent (Vaz *et al.*, 2017), les Sporobolales et notamment le genre *Rhodotorula* sont évoqués pour leur implication dans la dégradation du bois dans des forêts atlantiques du Brésil. Nos données apporteront une contribution à la distribution de ce genre en Amérique du Sud. Enfin, une séquence affiliée au Tricholomataceae a été obtenue. Cette famille est très bien connue pour héberger un nombre important d'espèces de champignons ectomycorhiziens, mais aussi des champignons saprophytes. Parmi les séquences que nous avons obtenues, celle-ci est probablement issue d'une espèce qui forme régulièrement des sporophores visibles.

Ce premier jeu de 32 séquences nous indique donc, que la plupart des espèces fongiques impliquées dans les phases précoces de dégradation du bois dans les forêts guyanaises ne forment pas de fructification visible. L'usage des outils moléculaires de caractérisation de l'ADN reste indispensable.

#### PCR, séquençage, biodiversité et durabilité des bois

L'étude de la biodiversité fongique en fonction de la durabilité des bois soulèvent quelques remarques :



Certaines éprouvettes de piégeage n'ont conduit à aucun produit d'amplification : certaines d'entre elles correspondent à des bois de forte durabilité. Une question se pose : est-ce lié à la méthodologie ou à la durabilité du bois ?

Les dosages d'ADN révèlent que les bois de durabilité forte ont une concentration relativement moins importante que celles de durabilité faible ; ces échantillons devront suivre un protocole de PCR adapté du fait de leur faible teneur en ADN.

#### Apport des données de séquençage Illumina à la connaissance des champignons de Guyane française

O'Brien *et al.* (2005) et Tian *et al.* (2017) dans deux situations différentes trouvent des communautés fongiques dominées par les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Nos observations, sont cohérentes avec les leurs, même si la proportion d'Ascomycètes, dans notre cas paraît plus importante. La part de Zygomycètes que nous observons est conforme aux résultats de O'Brien *et al.* (2005) et s'écarte sensiblement des observations de Tian *et al.* (2017). A ce stade, nous n'avons pas assez de recul pour dire si cette différence est due à une différence réelle de composition des communautés fongiques ou s'il s'agit d'un artefact lié à l'application d'une méthode, notamment le choix des primers.

Parmi les données Illumina nous avons retrouvé des affiliations taxonomiques correspondant à chacune des séquences obtenues par séquençage Sanger. Ainsi, le Genre Zygomycètes *Umbelopsis* est présent sous forme de 13 OTUs issues du séquençage Illumina et dans 2 OTUs issues du séquençage Sanger. Le même cas de figure est également observé pour les genres *Gerronema* et autres. Cette cohérence que nous attendions nous permet d'envisager de progresser rapidement dans la compréhension du fonctionnement des communautés fongiques impliquées dans la dégradation des bois.

#### *1.b.Perspectives :*

A l'issue de mon stage, des avancées notables concernant la mise au point des protocoles expérimentaux ont été consignées. Mes résultats sont pour leur part, encore parcellaires en date de rédaction de ce mémoire. Ils vont être complétés au cours du mois à venir par :

- Les analyses des données Sanger pour les 306 produits d'amplification restant, obtenus à partir du dispositif de piégeage fongique. Cette analyse nous permettra de conclure sur une corrélation éventuelle entre durabilité des bois et diversité des champignons impliqués dans leur dégradation. Elle permettra également d'étudier l'influence de la date des prélèvements et des sites de prélèvement sur la diversité fongique.
- L'analyse des données métagénomiques.



L'objectif de cette double approche est, à terme, de mettre en cohérence les données sur la diversité totale du ligniocellulobiome et celles concernant la diversité et l'organisation des microbiotes fongiques au sein des différents types d'éprouvettes étudiées dans les dispositifs de dégradation contrôlée des bois. Cette comparaison permettra alors de mieux comprendre le fonctionnement des éprouvettes-filtres (et donc des différents types de bois) dans le recrutement de tel ou tel champignon ou communauté fongique issus de l'échantillonnage total.

Une étude sur le terrain sera par ailleurs à terme nécessaire pour corréler les résultats de laboratoire aux observations *in situ* afin d'aller plus loin dans l'identification taxonomique des genres et espèces à partir des caractères morphologiques macro et microscopiques d'identification fongique.

Par ailleurs, en prévision des travaux ultérieurs de l'équipe, j'ai également amorcé, parallèlement à l'étude métagénomique fongique, une étude métagénomique ciblée bactérienne en vue de la caractérisation, sur mon matériel biologique (dispositif de prélèvement aléatoire de bois mort), des bactéries associées à la dégradation du bois (Annexe 7).



## V. Références bibliographiques

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Amusant, N., Migge, M., Thibaut, B. & Beauchene, J. (2014). Diversity of decay resistance strategies of durable tropical woods species : *Bocopa prouacensis* Aublet, *Vouacapoua americana* Aublet, *Inga alba* (Sw.) Wild. *Int Biodeter Biodegr* **94**: 103-108. doi:10.1016/j.ibiod.2014.06.012.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Amer J Bot* **98**(3): 426-438. doi:10.3732/ajb.1000298.
- Barret, M., Guimbaud, J.F., Darasse, A. & Jacques, M.A. (2016). Plant microbiota affect seed transmission of phytopathogenic microorganismes. *Molecular plant pathology* **17** (6): 791-795. doi: 10.1111/mp.12382.
- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A. & Amir, H. (2016). Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenomic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits". *Mol Ecol* **25**: 2258-2272.
- Cairney, J. (2005). Basidiomycete mycelia in forest soils: Dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycological Research*, **109**(1), 7-20. doi:10.1017/S0953756204001753.
- Cheype, J.L. (2015). Quelques champignons étonnant de la Guyane française. *Bull. Mycol. Bot Dauphiné-Savoie* **218**: 53-63.
- Cheype, J.L. & Campo, E. (2012). *Russula rubropunctatissima* Cheype & E. Campo une russule découverte en Guyane française. *Bull Soc Mycol Fr* **128** (1-2), p. 127-135.
- Colin, A. & Derrière, N. (2005). La forêt française : un puits de carbone ? Son rôle dans la limitation des changements climatiques. *L'IF n° 7*, 8 p. ISSN : 1769-6755.
- Correa de Souza R.S., Okura, V.K., Armanhi J.S.L., Jorin, B., Lozano, N., da Silva, M.J., Gonzalez-Guerrero, M., de Araujo, L.M., Verza, N.C., Bagheri, H.C., Imperial, J., & Arruda, P. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific reports* **6**: 28774. doi: 10.1038.
- Courtecuisse, R., Decock, C., Fournier, J., Gruhn, G., Henkel, T., Lechat, C., Welti, S., Roy, M., Schimann, H. & Sagne, A. (2012). Un inventaire taxonomique et moléculaire des champignons de Guyane. *Nouragues, Paracou, Rapport de mission FunGUY*, 35 p.
- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Amatangelo, K., et al. (2008). Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecol Lett* **11**: 1065-1071.
- Cramer, B., Faber, E., Gerling, P. & Krooss, B.M. (2001). Reaction Kinetics of Stable Carbon Isotopes in Natural Gas Insights from Dry, Open System Pyrolysis Experiments. *Energy Fuels* **15**(3): 517-532.
- Dighton, J.F., White, J.F. & Oudemans, P. (2005). *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Third Edition, CRC Press.
- Eastwood, D.C. (2014). Evolution of Fungal Wood Decay. In: *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*. ACS Symposium Series, Vol. 1158. Chapter 5, pp 93-112. doi: 10.1021/bk-2014-1158.ch005.
- Fukasawa, Y., Osono, T. & Takeda, H. (2011). Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. *Mycologia* **103**(3):474-82. doi: 10.3852/10-246.
- Gibertoni, T.B., Medeiros, P.S., Soares, A.M.S., Gomes-Silva, A.C., Santos, P.J.P., Sotao, H.M.P., Ferreira, L.V. & Savino, E. (2016). The distribution of polypore fungi in endemism centres in Brazilian Amazonia. *Fungal Ecology* **20**: 1-6. doi:10.1016/j.funeco.2015.09.012.
- Gomez-Hernandez, M., Williams Linera, G., Guevara, R. & Lodge, D.J. (2012). Patterns of macromycete community assemblage along an elevation gradient: options for fungal gradient and metacommunity analyse. *Biodivers Conserv* **21**: 2247-2268. doi:10.1007/s10531-011-0180-3.
- Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P. & Nilsson, R.H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* **25**: 38-47.
- Hoffmann, K., Pawlowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G.S., Benny, G.L., Kirk, P.M. & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* **30**:56-76. doi: 10.3767/003158513X666259.
- Horak, E. & Cheype, J.L. (2007). *Entoloma dragonosporum* (Singer) E. Horak et E. luteosplendendum sp. nov. deux espèces remarquables de la Guyane française. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **123**(3-4), p. 251- 262.
- Kerfahi, D., Tripathi, B.M., Dong, K., Rusea, G. & Adams, J.M. (2016). Rainforest conversion to rubber plantation may not result in lower soil diversity of bacteria, fungi and nematodes. *Microb Ecol* **72**: 359-371. doi:10.1007/s00248-016-0790-0.
- Lacercat-Didier, L., Berthelot, C., Foulon, J., Errard, A., Martino, E., Chalot, M. & Blaudez, D. (2016). New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza* **26**(7): 657-671. doi: 10.1007/s00572-016-0699-y.





- Li, W. & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**: 1658-1659.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, J. C., et al. (2004). Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Amer J Bot* **91**: 1446-1480.
- O'Brien, H.E, Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J-M. & Vilgalys, R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (9): 5544-5550. doi:10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005
- R Development Core Team (2011). "R: A Language and Environment for Statistical Computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Richter, D.L. & Glaeser, J.A. 2015. Wood decay by *Chlorociboria aeruginascens* (Nyl.) Kanouse (Helotiales, Leotiaceae) and associated basidiomycete fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **105**: 239-244.
- Rosenberg, E. & Zilber-Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth defects Res* **9**:56-66.
- Seibold, S., Bässler, C., Brandl, R., Gossner, M.M., Thorn, S., Ulyshen, M.D. & Müller, J. (2015). Experimental studies of dead-wood biodiversity - A review identifying global gaps in knowledge. *Biological Conservation* **191**: 139-149. doi:10.1016/j.biocon.2015.06.006.
- Smith, M.E., Henkel, T.W., Uehling, J.K., Fremier, A.K., Clarke, H.D. & Vilgalys R. (2013). The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraimaea dipterocarpacea*. *PloS One* **8**: e55160.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M. Hibbett, D.S., & Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* **31**(1): 21-32.
- Tedersoo, L., Pärtel, K., Jairus, T., Gates, G., Poldmaa, K. & Tamm, H. (2009). Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology* **11**(12):3166-3178. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02020.x.
- Tedersoo, L., May, T.W. & Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**: 217-263.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**(6213):1256688-1 to 10. Doi: 10.1126/science.1256688.
- Tian, Q., Taniguchi, T., Shi W-Y, Li, G., Yamanaka, N. & Du, S. (2017). Land-use types and soil chemical properties influence soil microbial communities in the semiarid Loess Plateau region in China. *Science Report* **7**: 45289. PMCID: PMC5368647 doi: 10.1038/srep45289
- Urbina, H., Scofield, D.G., Cafaro, M. & Rosling, A. (2016). DNA-metabarcoding uncovers the diversity of soil inhabiting fungi in the tropical island of Puerto Rico. *MycoScience* **57**: 217-227. doi:10.1016/j.myc.2016.02.001.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.F., Jacques, M.A., Lebrun, M.H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.A., Roumagnac, P. & Candresse T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**: 29 – doi: 10.3389/fcimb.2014.00029.
- Vaz, A.B.M., Fonseca, P.L.C., Leite, L.R., Badotti, F., Salim, A.C.M., Araujo, F.M.G., Cuadros-Orellana, S., Duarte, A.A., Rosa, C.A., Oliveira, G. & Goes-Neto, A. (2017). Using Next-Generation Sequencing (NGS) to uncover diversity of wood-decaying fungi in neotropical atlantic forests. *Phytotaxa* **295**:1-21. doi.org/10.11646/phytotaxa.295.1.1
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp.315-322. Academic Press, New York, New York.
- Wintzingerode, V.F., Göbel, U.B. & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **21**: 213-229. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x
- Yamashita, S., Hattori, T., Lee, S.S. & Okabe, K. (2015). Estimating the diversity of wood-decaying polypores in tropical lowland rain forests in Malaysia: the effect of sampling strategy. *Biodivers Conserv* **24**: 393-406. doi:10.1007/s10531-014-0815-2.
- Zaremski, A., Bakkali-Yakhlef, S., Chaintreuil, C., Abbas, Y., Prin, Y., Abourouh, M., Ducousso, M. & Baudassé, C. (2006). Caractérisation moléculaire du M'jej, agent de dépérissement des cédraies du Maroc. *Bois For Trop* **291**: 67-72.
- Zaremski, A., Ducousso, M., Domergue, O., Fardoux, J., Rangin, C., Fouquet, D., Joly, H., Sales, C., Dreyfus, B. & Prin, Y. (2005). In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot Basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. *Can J For Res* **35**: 1256-1260. doi:10.1139/X05-056.
- Zhao, J., Zeng, J., de Hoog, G.S., Attili-Angelis, D. & Prenafeta-Boldù, F.X. (2010). Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. *Microbiological Ecology* **60**(1):149-156. doi: [10.1007/s00248-010-9651-4](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9651-4).



## ANNEXES

**Annexe 1 :** Tableau des espèces ligneuses ayant fait l'objet de prélèvements de bois : codification par abréviation. Classe de durabilité naturelle de 1 (très durable) à 5 (très peu).

<i>Espèce, famille</i>	<i>Nom vernaculaire</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Diamètre</i>	<i>Durabilité</i>
<i>Erisma uncinatum</i> , Vochysiaceae	Jaboty	<b>Eu</b>	90 cm	1
<i>Simarouba amara</i> , Simaroubaceae	Simarouba	<b>Sa</b>	Témoin	1
<i>Virola michelii</i> , Myristicaceae	Yayamadou	<b>Vm</b>	ND	1
<i>Qualea rosea</i> , Vochysiaceae	Gonfolo rose	<b>Qr</b>	ND	2
<i>Hymenolobium flavum</i> , Fabaceae	Saint-Martin jaune	<b>Hf</b>	110 cm	2/3
<i>Symphonia</i> sp1, Clusiaceae	Manil	<b>Sg</b>	60 cm	3
<i>Carapa procera</i> , Meliaceae	Carapa	<b>Cp</b>	51 cm	3
<i>Sextonia rubra</i> , Lauraceae	Grignon	<b>Sr</b>	88 cm	4
<i>Vouacapoua americana</i> , Caesalpiniaceae	Wacapou	<b>Va</b>	45 cm	5
<i>Dicorynia guianensis</i> , Caesalpiniaceae	Angélique	<b>Dg</b>	62 cm	5

## **Annexe 2 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir des échantillons de sciure de bois.**

### **Lyse GLUCANEX**

- 1) Peser 300 mg de poudre de bois dans un eppendorf de 2 ml
- 2) Ajouter 1,5 ml de tampon Glucanex frais à pH 6, incuber toute la nuit à 30°C sous agitation.
- 3) Centrifuger à 15.000 g pendant 2 min 30 et jeter le surnageant
- 4) Plonger le tube dans l'azote liquide et transférer le culot dans un mortier afin de le broyer dans l'azote liquide.

### **Lyse MATAB**

- 5) Ajouter 1 ml de tampon lyse (préchauffé à 70°C pour dissoudre le MATAB). Broyer l'échantillon jusqu'à obtenir une pâte marron/noir homogène. Transférer dans un nouveau tube de 2 ml.

Ajouter 8µl de RNase (10 ng/µl). Compléter le tube à 1.5 ml de tampon lyse.

- 6) Vortexer 20 s et incuber 2h à 70°C avec agitation.
- 7) Refroidir les tubes sur glace jusqu'à température ambiantes.
- 8) Ajouter 500 µl de CIAA et agiter une centaine de fois par inversion. (20 ml alcool isomyle + 480 ml de chloroforme)
- 9) Centrifuger 30 min à 5.000 g à température ambiante.
- 10) Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube de 2 ml. Un second lavage au CIAA est conseillé (étape 8 à 10)
- 11) Ajouter 700 µl d'isopropanol refroidie à 4°C
- 12) Mélanger doucement par inversion jusqu'à formation d'une pelote d'ADN ou centrifuger 30 min à 10.000 g pour obtenir un culot si la pelote d'ADN n'est pas visible.
- 13) Jeter le surnageant et ajouter 1 ml d'EtOH 100% (conservé à -20°C) agiter doucement par inversion 1 à 2 fois
- 14) Centrifuger 2 min à 12.000g (4°C si possible) et jeter le surnageant.
- 15) Ajouter 1 ml d'EtOH 70% (conservé à -20°C) agiter doucement par inversion 1 à 2 fois
- 16) Centrifuger 2 min à 12.000g (4°C si possible) et jeter le surnageant
- 17) Sécher le culot au SPEED-VAC (au moins 5 min), reprendre le culot dans un volume de 30 à 60 µl d'eau stérile préchauffé à 65°C

### Annexe 3 : Primers des gènes 16S et ITS utilisés pour la construction des bibliothèques de métagénomique, avec les tails Illumina Nextera.

PCR 1 - Primers for 16S gene					
Oligo	Orientation	Append to 5' (Nextera transposase sequence)	Farm Shift	Primers	Complete sequence (5' -> 3')
515Y_FS1	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNGTGYCA GCMGCCGCGGTAA
515Y_FS2	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNGTGYCAG CMGCCGCGGTAA
515Y_FS3	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNGTGYCAGC MGCCGCGGTAA
926R	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	CCGYCAATTYMTTTRAGT TT	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNCCGYC AATTYMTTTRAGTTT
PCR 1 - Primers for ITS gene					
Oligo	Orientation	Append to 5'	Farm Shift	Primers	Complete sequence (5' -> 3')
ITS1FI2_FS1	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	GAACCGGCGGARGGATC A	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNGAACCGGCGGARGGATCA
ITS1FI2_FS2	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNN	GAACCGGCGGARGGATC A	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNGAACCGGCGGARGGATCA
ITS1FI2-FS3	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNN	GAACCGGCGGARGGATC A	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNGAACCGGCGGARGGATCA
ITS2	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	GCTGCGTTCTTCATCGAT GC	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNGCTGCGTTCTTCATCGATGC

PCR2 - Nextera Index	Primers
Index 1 Read	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG 3'
Index 2 Read	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC 3'

**Annexe 4 : Principales caractéristiques de séquences ITS du dispositif de piégeage.**

Assignation			Information Séquence	Assignation taxonomique par BLASTn				
N° d'acc	Nom Séquence	OTU 97%	Lignage RDP 95%	Identification	Identité	N° d'acc	Pourcentage	/lignée
ECT	>7V-ITS1_D12_090	0	Ascomycota ; Chaetothyales ; unclassified Herpotrichielladeae	<i>Exophiala bergeri</i>	99%	<a href="#">JX473281.2</a>		/exophiala
ECT	>9N-ITS1_E12_088	0	Ascomycota ; Chaetothyales ; unclassified Herpotrichielladeae	<i>Exophiala xenobiotica</i>	99%	<a href="#">KX982234.1</a>	at 99%	/exophiala
ECT	>8I-ITS1_E03_023	1	Ascomycota ; unclassified ascomycota	<i>Hymenoscyphus</i> sp. Trtsf14	97%	<a href="#">GU479911.1</a>		/helotiales
ECT	>12Y-ITS1_G07_051	1	Ascomycota ; unclassified ascomycota	<i>Hymenoscyphus</i> sp. Trtsf14	99%	<a href="#">GU479911.1</a>	at 98%	/helotiales
ECT	>4H-ITS1_B07_061	2	Unclassified fungus	<i>Hyaloscypha</i> sp. PWC-2015	91%	<a href="#">KJ663835.2</a>		/helotiales
ECT	>4X-ITS1_B12_094	3	Unclassified fungus	Uncultures fungus clone 3321K12	87%	<a href="#">KF617466.1</a>		/unclassified fungus
ECT	>4V-ITS1_B11_093	3	Unclassified fungus	uncultured fungus	86%	<a href="#">KF617466.1</a>	at 99%	/unclassified fungus
ECT	>3Z-ITS1_B06_046	4	Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>	94%	<a href="#">KM017728.1</a>		/mucorales
ECT	>9I-ITS1_E09_071	4	Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<a href="#">KC489480.1</a>	at 97%	/mucorales
ECT	>9M-ITS1_E11_087	4	Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<a href="#">KC489480.1</a>	at 97%	/mucorales
ECT	>7C-ITS1_D04_026	4	Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>	100%	<a href="#">KU847883.1</a>	at 99%	/mucorales
ECT	>7I-ITS1_D06_042	4	Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<a href="#">KU847883.1</a>	at 99%	/mucorales

ECT	>7P-ITS1_D09_073	4	<b>Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis</b>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<a href="#">KU727815.1</a>	at 99%	<i>/mucorales</i>
ECT	>13R-ITS1_H02_002	4	<b>Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis</b>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	96%	<a href="#">KM017728.1</a>	at 100%	<i>/mucorales</i>
ECT	>11D-ITS1_G04_020	4	<b>Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis</b>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<b>KU727815.1</b>	at 99%	<i>/mucorales</i>
ECT	>11G-ITS1_F11_085	4	<b>Zygomycota ; Mucorales ; unclassified Umbelopsis</b>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	99%	<a href="#">KC489480.1</a>	at 97%	<i>/mucorales</i>
ECT	>4M-ITS1_B09_077	5	<b>Unclassified fungus</b>	<i>Umbelopsis isabellina</i>	91%	<a href="#">JN206398.1</a>		<i>/mucorales</i>
ECT	>9L-ITS1_E10_072	6	<b>Unclassified fungus</b>	<i>Umbelopsis autotrophica</i>	99%	<a href="#">KU556567.1</a>		<i>/mucorales</i>
ECT	>8U-ITS1_E07_055	7	<b>Ascomycota ; unclassified ascomycota</b>	<i>Scytalidium</i> sp. SL3007	99%	<a href="#">AB986473.1</a>		<i>/helotiales</i>
ECT	>11C-ITS1_G06_036	8	<b>Ascomycota ; unclassified ascomycota</b>	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	97%	<a href="#">KF156305.1</a>		<i>/helotiales</i>
ECT	>13Q-ITS1_H06_034	9	<b>Basidiomycota ; Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Goffeauzyma metallitolerans</i>	89%	<a href="#">KY103489.1</a>		<i>/tremellales</i>
ECT	>13N-ITS1_G12_084	9	<b>Basidiomycota ; Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Goffeauzyma metallitolerans</i>	89%	<a href="#">KY103489.1</a>	at 100%	<i>/tremellales</i>
ECT	>1Z-ITS1_B01_013	9	<b>Basidiomycota ; Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Goffeauzyma aciditolerans</i>	92%	<a href="#">KY103481.1</a>	at 99%	<i>/tremellales</i>
ECT	>7W-ITS1_E01_007	9	<b>Basidiomycota ; Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Goffeauzyma aciditolerans</i>	86%	<a href="#">KY103481.1</a>	at 98%	<i>/tremellales</i>
ECT	>2K-ITS1_A11_095	10	<b>Ascomycota ; Eurotiales ; uncallisified penicillium</b>	<i>Penicillium citreonigrum</i>	100%	<a href="#">KU847865.1</a>		<i>/penicillium</i>
ECT	>5E-ITS1_C03_027	11	<b>Basidiomycota ; Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Gerronema</i> sp. KA12-1252	92%	<a href="#">KR673502.1</a>		<i>/tricholomataceae</i>

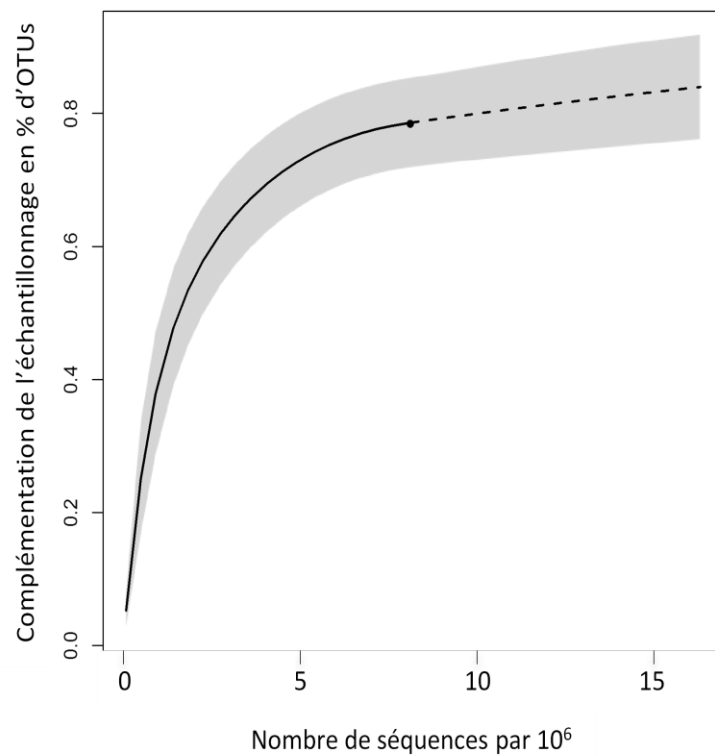
ECT	>1D-ITS1_A02_016	12	<b>Basidiomycota ;Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	91%	<a href="#">KY104789.1</a>		<i>/sporidiobolales</i>
ECT	>1H-ITS1_A04_032	12	<b>Basidiomycota ;Agaricomycetes ; unclassified Basidiomycota</b>	<i>Rhodotorula</i> sp. AL-S2	<b>94%</b>	<a href="#">JN255448.1</a>	at 98%	<i>/sporidiobolales</i>
ECT	>6B6-ITS1_H07_049	13	<b>Unclassified fungus</b>	<i>Goffeauzyma metallitolerans</i>	<b>86%</b>	<a href="#">KY103489.1</a>		<i>/tremellales</i>
ECT	>13S-ITS1_H03_017	14	<b>Unclassified fungus</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<b>92%</b>	<a href="#">KP053654.1</a>		<i>/saccharomycetales</i>
ECT	>13O-ITS1_H01_001	15	<b>Ascomycota ; saccharomycetales ; Candida</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<b>100%</b>	<a href="#">KT157518.1</a>		<i>/saccharomycetales</i>
ECT	>6R-ITS1_C08_060	15	<b>Ascomycota ; saccharomycetales ; Candida</b>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<b>99%</b>	<a href="#">KY401420.1</a>	at 100%	<i>/saccharomycetales</i>



**Annexe 5 :** Tableau des correspondances entre OTUs, nature des bois et leur durabilité (1 peu durable, 5 très durable)

Nom Séquence	OTU	Nature du bois	Durabilité (D)
>7V-ITS1_D12_090	0	Sr	2
>9N-ITS1_E12_088	0	Va	1
>8I-ITS1_E03_023	1	Qr	4
>12Y-ITS1_G07_051	1	Cp	3
>4H-ITS1_B07_061	2	Sa	1
>4X-ITS1_B12_094	3	Cp	3
>4V-ITS1_B11_093	3	Dg	1
>3Z-ITS1_B06_046	4	Sr	2
>9I-ITS1_E09_071	4	Dg	1
>9M-ITS1_E11_087	4	Sa	1
>7C-ITS1_D04_026	4	Cp	3
>7I-ITS1_D06_042	4	Hf	4/3
>7P-ITS1_D09_073	4	Sa	1
>13R-ITS1_H02_002	4	Sa	1
>11D-ITS1_G04_020	4	Sa	1
>11G-ITS1_F11_085	4	Dg	1
>4M-ITS1_B09_077	5	Va	1
>9L-ITS1_E10_072	6	Hf	4/3
>8U-ITS1_E07_055	7	Eu	5
>11C-ITS1_G06_036	8	Sg	3
>13Q-ITS1_H06_034	9	Hf	4/3
>13N-ITS1_G12_084	9	Qr	4
>1Z-ITS1_B01_013	9	Dg	1
>7W-ITS1_E01_007	9	Hf	4/3
>2K-ITS1_A11_095	10	Sg	3
>5E-ITS1_C03_027	11	Sg	3
>1D-ITS1_A02_016	12	Dg	1
>1H-ITS1_A04_032	12	Sa	1
>6B6-ITS1_H07_049	13	Hf	4/3
>13S-ITS1_H03_017	14	Qr	4
>13O-ITS1_H01_001	15	Sg	3
>6R-ITS1_C08_060	15	Hf	4/3

**Annexe 6 :** Courbe d'accumulation du nombre d'OTUs en fonction de l'effort d'échantillonnage pour l'ensemble des quatre sites ; l'ordre des OTUs sur les axes des x a été tiré au hasard 1000 fois, chaque courbe représente la moyenne de 1000 échantillons aléatoires. La complémentation d'échantillon interpolée observée est représentée avec la ligne en trait plein et la partie estimée est représentée avec la ligne pointillée. La zone en grisée qui entoure la courbe représente l'intervalle de confiance à 95 %.



**Annexe 7 :** Descriptif des amorces 16S utilisée lors du séquençage Illumina, les séquences de PNA mitochondriale et chloroplastique. Descriptif de la réaction PCR et du programme d'amplification pour la partie 16S (Soares Correa de Souza *et al.*, 2016)

PCR 1 - Primers for 16S gene				
Oligo	Orientation	Append to 5' (Nextera transposase sequence)	Farm Shift	Primers
515Y_FS1	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA
515Y_FS2	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA
515Y_FS3	Forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNN	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA
926R	Reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	NNNNNN	CCGYCAATTYMTTTRAGT TT

**anti-mitochondrial PNA (mPNA)**  
**anti-plastid PNA (pPNA)**

GGCAAGTGTTCTTCGGA  
 GGCTCAACCCTGGACAG

Mix	16S	16S (9 puits)
ADN	5 µl (100 ng – 10 ng)	5 µl (100 ng – 10 ng)
Primer F	1 µl (10 pmol)	9 µl
Primer R	1 µl (10 pmol)	9 µl
Enzyme (Kapa hifi)	12,5 µl (mix 2X)	112,5 µl
PNA m	1 µl (10 pmol)	9 µl
PNA r	1 µl (10 pmol)	9 µl
H2O	3,5 µl	31,5 µl
<b>Volume finale</b>	<b>25 µl</b>	<b>225 µl</b>

Cycle PCR 16 S		
Température	Temps	Produit
95°C	5 min.	
95°C	30 sec.	
78°C	10 sec.	PNA ] 25 cycles
55°C	30 sec.	Amorce 515Y ]
72°C	60 sec.	Kapa ]



## RESUME

Nos connaissances des rôles des champignons tropicaux dans la décomposition du bois et par conséquent du cycle de carbone sont très fragmentaires. Pour développer ces connaissances, un dispositif d'écologie microbienne a été mis en place en forêt guyanaise sur sols latéritiques et sols sableux en sommet de colline et en bas-fond. Sur ces quatre sites, une approche métagénomique Illumina ciblée ITS1 fongique a été mise en œuvre de paire avec un dispositif de piégeage *in situ* des champignons lignivores. L'approche métagénomique a permis d'obtenir 8.484.308 séquences de champignons réparties à 57 % Ascomycètes, 17 % Basidiomycètes, 2 % Zygomycètes et 24 % autres, en cohérence avec les études antérieures et confirme les faiblesses de nos connaissances en mycologie tropicale. L'analyse par séquençage Sanger des ITS fongiques piégés dans des éprouvettes de bois standardisés a permis de préciser les taxons impliqués dans la dégradation de bois de durabilité naturelle différente.

**Mots clef :** Guyane française, ITS fongique, Forêts tropicales, Pourriture du bois, Illumina, Cycle du carbone

## SUMMARY

Our knowledge of the roles of tropical fungi in the decomposition of wood and consequently of the carbon cycle is very fragmentary. To develop this knowledge, a microbial ecology device has been set up in the Guyanese forest on lateritic soils and sandy soils at the top of the hill and in the shoal. At these four sites, a fungal ITS1 targeted Illumina metagenomic approach has been implemented as a pair with an *in situ* trapping device for lignivorous fungi. The metagenomic approach enabled to obtain 8,484,308 fungal sequences distributed at 57 % Ascomycota, 17 % Basidiomycota, 2 % Zygomycota and 24 % others, consistent with previous studies and confirms the weaknesses of our knowledge in tropical mycology. The Sanger sequencing analysis of the fungi *in situ* trapped in standardized wood pieces enabled to specify the taxa involved in the degradation of wood of different natural durability.

**Keywords:** French Guiana, fungal ITS, Tropical forests, Wood rot, Illumina, Carbon cycling